



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ
ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΦΥΤΩΝ ΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ**



ΜΟΣΧΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης σε πολυφαινολικά
εκχυλίσματα από ποικιλία φυτών της ελληνικής χλωρίδας

Assessment of antioxidant activity of polyphenolic extracts
from a variety of plants of Greek flora

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σέρκος Χαρουτουγιάν: Καθηγητής Χημείας στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Στάγκου Δημητρίου, Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Κουρέτα Δημήτριο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου διατριβή στο εργαστήριο του.

Τέλος ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου για τη βοήθεια τους και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη μελέτη των αντιοξειδωτικών μορίων. Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια τα οποία έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών αποτελούν οι φυτικές πολυφαινόλες, οι οποίες έχουν πληθώρα βιολογικών ιδιοτήτων. Η σημαντικότερη είναι η ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών προστατεύοντας τον οργανισμό από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες, έχουν δηλαδή την ικανότητα να δρουν ως αντιοξειδωτικοί και χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Ακόμη, εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν εκχυλίσματα από τα φυτά *Ailanthus altissima* της οικογένειας Simarubaceae, *Atropa belladonna* της οικογένειας Solanaceae, *Epilobium angustifolium* της οικογένειας Onagraceae, *Inula oxylepis* της οικογένειας Asteraceae, *Lysimachia vulgaris* της οικογένειας Primulaceae, *Nicotiana glauca* της οικογένειας Solanaceae, *Nigella sativa* της οικογένειας Ranunculaceae, *Oropanax chironium* της οικογένειας Apiaceae και *Salvia triloba* της οικογένειας Lamiaceae. Εξετάστηκε *in vitro* η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τις μεθόδους DPPH και ABTS, και το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Στις μεθόδους DPPH και ABTS ισχυρότερο είναι το εκχύλισμα *Epilobium angustifolium* (81 Exc) με IC_{50} 14,6 $\mu\text{g/ml}$ για τη μέθοδο DPPH και IC_{50} 7,4 $\mu\text{g/ml}$ για τη μέθοδο ABTS. Στη μέθοδο Folin-Ciocalteu το εκχύλισμα *Epilobium angustifolium* (81 Exc) παρουσίασε τη μεγαλύτερη τιμή (184 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας).

ABSTRACT

In recent years there is an increasing interest on the study of antioxidant molecules. Antioxidants are molecules able to interact and neutralize free radicals. One of the most significant group of antioxidants are plant polyphenols which contain a plethora of biological properties. The most important is their ability to neutralize free radicals protecting from oxidative stress, i.e. can act as antioxidants and chemopreventive factors. Furthermore exhibit anti-inflammatory and antibacterial activities.

In the present study were examined extracts from the plants *Ailanthus altissima* (Simarubaceae family), *Atropa belladonna* της (Solanaceae family), *Epilobium angustifolium* (Onagraceae family), *Inula oxylepis* (Asteraceae family), *Lysimachia vulgaris* (Primulaceae family), *Nicotiana glauca* (Solanaceae family), *Nigella sativa* (Ranunculaceae family), *Opopanax chironium* (Apiaceae family) and *Salvia triloba* (Lamiaceae family). We tested in vitro the antioxidant activity of the extracts using the DPPH and ABTS assays, and the total phenolic content using the Folin-Ciocalteu assay. The extract from *Epilobium angustifolium* (81 Exc) was the most potent with IC_{50} 14,6 $\mu\text{g/ml}$ for the DPPH assay and IC_{50} 7,4 $\mu\text{g/ml}$ for the ABTS assay. Regarding the Total Phenolic Content assessed by the Folin-Ciocalteu assay, the extract from *Epilobium angustifolium* (81 Exc) exhibited the highest value (184 mg TPC/g dry extract).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	9
1.1.1 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών.....	10
1.1.2 Βιολογική δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου.....	12
1.2 Οξειδωτικό στρες.....	13
1.2.1 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες.....	13
1.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες.....	14
1.3.1 Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών του οργανισμού.....	15
1.4 Φυτικές πολυφαινόλες.....	16
1.4.1 Ταξινόμηση φυτικών πολυφαινολών.....	16
1.5 <i>Salvia triloba</i>	20
1.6 <i>Oropanax chironium</i>	21
1.7 <i>Nigella sativa</i>	21
1.8 <i>Nicotiana glauca</i>	22
1.9 <i>Lysimachia vulgaris</i>	23
1.10 <i>Epilobium angustifolium</i>	23
1.11 <i>Atropa belladonna</i>	24
1.12 <i>Ailanthus altissima</i>	25
1.13 <i>Inula oxylepsis</i>	26
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	26
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
3.1. Αντιδραστήρια.....	27
3.2. Εκχυλίσματα.....	27
3.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH. 28	
3.3.1. Πειραματική διαδικασία.....	28
3.3.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας – Στατιστική ανάλυση.....	29
3.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS. 30	
3.4.1. Πειραματική διαδικασία.....	30
3.4.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας – Στατιστική ανάλυση.....	31
3.5. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (Total Polyphenolic Content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	32
3.5.1. Πειραματική διαδικασία.....	32

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH.....	34
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS.....	39
4.3 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινόλων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	45
4.4 Συνολικά αποτελέσματα.....	45
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες ορίζονται ως μόρια ή άτομα που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα, τα οποία έχουν δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης (Halliwell & Gutteridge, 1990). Μπορούν να δημιουργηθούν είτε με προσθήκη είτε με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή τους στιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Οι ελεύθερες ρίζες λόγω της αστάθειάς τους είναι ιδιαίτερα δραστικές και μπορούν να προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια και να δημιουργήσουν βλάβες στη λειτουργία του κυττάρου (Lobo et al., 2010). Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου, το οποίο έχει στον πυρήνα του ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο αυξάνει τη δραστικότητα του ατόμου ή του μορίου γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος ηλεκτρονίων. Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου, δηλαδή ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο (Reactive Oxygen Species, ROS) και οι δραστικές μορφές αζώτου, δηλαδή ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το άζωτο (Reactive Nitrogen Species, RNS) (Sengupta et al., 2004). Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες.

Πίνακας 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	Σύμβολο
Ρίζα Υδροξυλίου (Hydroxyl Radical)	OH [•]
Μονήρες Οξυγόνο (Singlet Oxygen)	O ₂
Ρίζα Σουπεροξειδίου (Superoxide Radical)	O ₂ ^{•-}
Ρίζα Αλκοξυλίου (Alkoxyl Radical)	RO [•]
Ρίζα Περοξυλίου (Peroxyl Radical)	ROO [•]
Όζον (Ozone)	O ₃
Υπεροξειδίο του Υδρογόνου (Hydrogen Peroxide)	H ₂ O ₂
Υδροϋπεροξειδίο (Hydroperoxide)	ROOH

Πίνακας 2. Δραστικές μορφές αζώτου

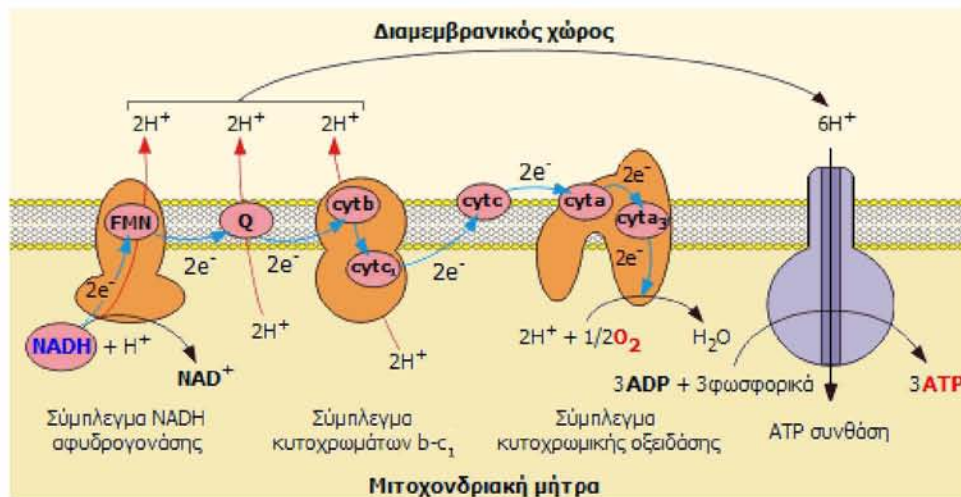
Δραστικές Μορφές Αζώτου	Σύμβολο
Περοξυνιτρίτης (Peroxynitrite)	ONOO ⁻
Μονοξείδιο του Αζώτου (Nitric Oxide)	NO [•]
Διοξείδιο του Αζώτου (Nitric Dioxide)	NO ₂
Περοξυνιτρώδες Οξύ (Peroxynitrous Acid)	ONOOH

1.1.1 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται στον οργανισμό είτε ενδογενώς είτε λόγω εξωγενών παραγόντων.

1.1.1.1 Ενδογενείς πηγές ελεύθερων ριζών

- Η κύρια πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Τα ηλεκτρόνια των NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) (Εικόνα 1) μέσω των οποίων μεταφέρονται τα ηλεκτρόνια. Ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται ως ATP μέσω της συνθάσης του ATP. Το οξυγόνο το οποίο δεν ανάγεται σε νερό θα μετατραπεί σε δραστικές μορφές (Παπαγαλάνης, 2014).



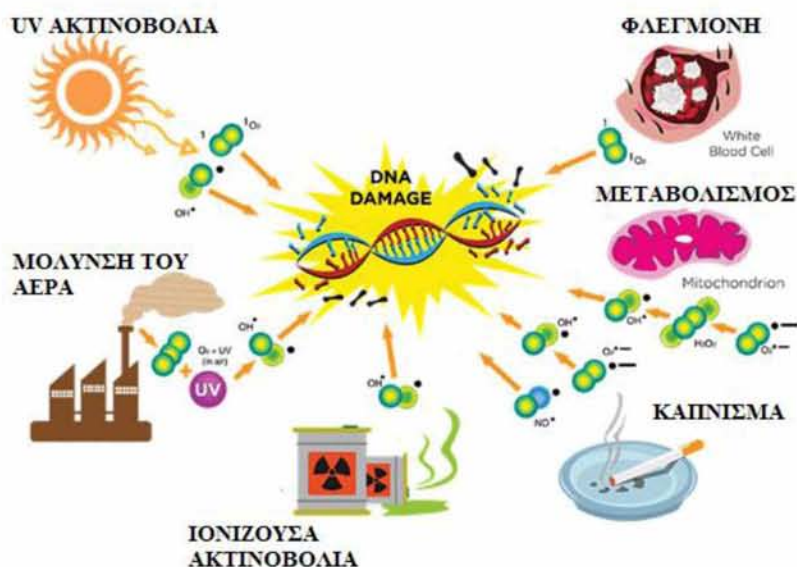
Εικόνα 1. Σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων – Οξειδωτική φωσφορυλίωση

- Το οξυγόνο που εισέρχεται στην κυκλοφορία στον οργανισμό αλλά δεν καταλήγει στα μιτοχόνδρια, λειτουργεί σαν υπόστρωμα για ενζυμικά συστήματα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μερικά ένζυμα που μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο είναι: NADH-οξειδάση, οξειδάση του CYT-P450, κυκλοξυγενάση και οξειδάση της ξανθίνης. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται παραπροϊόντα όπως το σουπεροξειδίο ($O_2^{\cdot-}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα υδροξυλίου (HO^{\cdot}) (Παπαγαλάνης, 2014).
- Ιόντα μετάλλων, όπως ο σίδηρος (Fe) και ο χαλκός (Cu), είναι ενζυμικοί συμπαράγοντες και όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα στα βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια και να οδηγήσουν στην καταστροφή τους όπως οι πρωτεΐνες, τα λίπη και το DNA (Barrera, 2012).
- Τέλος, ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού αποτελούν πηγή ελεύθερων ριζών καθώς παράγουν ρίζες προκειμένου να καταπολεμήσουν εξωγενείς παράγοντες, όπως βακτήρια (Knight, 2000).

1.1.1.2 Εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να παραχθούν από εξωγενείς παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα, η υπεριώδης ακτινοβολία και η περιβαλλοντική ρύπανση (Koren, 1995). Επίσης, ελεύθερες ρίζες παράγονται από τη δράση φαρμάκων (Naito et al., 1998),

άλλων ξενοβιοτικών, όπως τοξίνες και εντομοκτόνα αλλά και από το αλκοόλ (Elsayed et al., 1992, Obata et al., 2001). Σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι επίσης η διατροφή (Ames, 1986, Phaniendra et al., 2015).



Εικόνα 2. Εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ελεύθερων ριζών

1.1.2 Βιολογική δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου

1.1.2.1 Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες διότι συμμετέχουν σε σημαντικές διαδικασίες στον οργανισμό. Δύο από τις πιο σημαντικές λειτουργίες των ελεύθερων ριζών είναι ότι χρησιμεύουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι (Rimbach et al., 1999) και συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα (Finaud et al., 2006).

1.1.2.2 Αρνητικές επιδράσεις

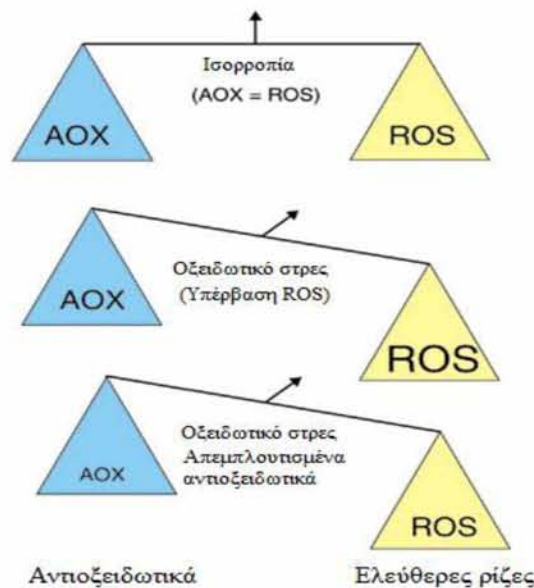
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου παρουσιάζουν αρνητικές επιδράσεις καθώς αλλάζουν τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρούν (Cooper et al., 2002). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου σε υψηλές συγκεντρώσεις θεωρούνται επιβλαβείς για τα συστατικά του κυττάρου. Είναι υπεύθυνες για την οξείδωση των λιπιδίων, του DNA και των πρωτεϊνών. Η μόνιμη τροποποίηση του γενετικού υλικού, που προκαλείται από οξειδωτική βλάβη, αποτελεί το πρώτο βήμα για την καρκινογένεση, την μεταλλαξιγένεση και την γήρανση (Lobo et al., 2010, Valko et al., 2006, Leaf et al., 1997).

1.2 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, υπέρ των πρώτων που μπορεί να οδηγήσει σε πιθανή βλάβη. Τα οξειδωτικά σχηματίζονται ως φυσικά προϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού (Sies, 1997).

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από:

1. Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό συμβαίνει είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε λόγω μείωσης των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
2. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS είτε λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ROS.



Εικόνα 3. Οξειδωτικό στρες

1.2.1 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες

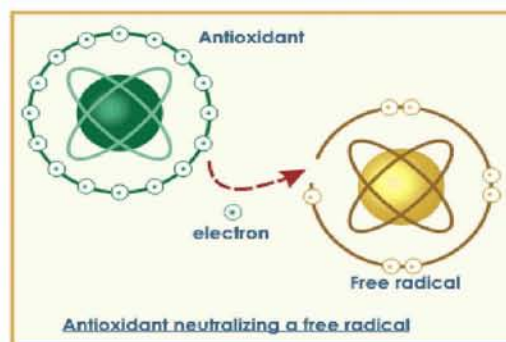
Υπάρχει πληθώρα αναφορών στη βιβλιογραφία για το οξειδωτικό στρες και τις παθήσεις που προκαλεί. Είναι γνωστό ότι συμβάλλει σε όλες τις φλεγμονώδεις ασθένειες. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται κάποιες από τις ασθένειες που προκαλεί (Lobo et al., 2010).

Πίνακας 3. Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες

Ασθένειες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες
Alzheimer
Νόσος του Πάρκινσον
Μυϊκή δυστροφία
Καταρράκτης
Καρκίνος
Γαστρικά έλκη
Σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας

1.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Σύμφωνα με τους Halliwell & Gutteridge (1989) ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιοδήποτε συστατικό το οποίο όταν βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με εκείνη ενός προς οξείδωση υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος. Η δράση των αντιοξειδωτικών βασίζεται στην παρεμπόδιση της οξείδωσης των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες ή στον περιορισμό του σχηματισμού ελεύθερων ριζών (Scalbert et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά δρουν είτε προσφέροντας στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει εμποδίζοντας έτσι τη δράση τους (Εικόνα 4), είτε ενεργοποιώντας τα ενδογενή αμυντικά συστήματα των οργανισμών (Halliwell B, 2001).



Εικόνα 4. Τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών

1.3.1 Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών του οργανισμού

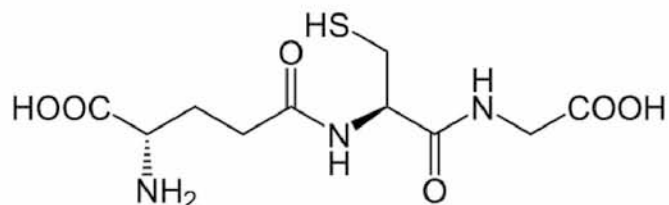
Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να ενυπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό (ενδογενή) ή να προσλαμβάνονται από τη διατροφή (εξωγενή). Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους ενζυμικούς και τους μη ενζυμικούς (Lobo et al., 2010).

Πίνακας 4. Ενδογενή αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικά ένζυμα	Αντιοξειδωτικά που δρουν με μη ενζυμικό μηχανισμό
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)
Καταλάση (CAT)	Ουβικινόλη
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)	Ουρικό οξύ

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι το πιο σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό, καθώς παρουσιάζει μεγάλη δράση. Βιοχημικά είναι ένα τριπεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη (Εικόνα 5). Μέσα στους οργανισμούς υπάρχει σε δύο μορφές: την ανηγμένη και την οξειδωμένη. Με τις μορφές αυτές, έχει τον ρόλο μεταφορέα του υδρογόνου και αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες σταθερότητας του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου.



Εικόνα 5. Βιοχημική αναπαράσταση γλουταθειόνης

Μερικά εξωγενή αντιοξειδωτικά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Lobo et al., 2010).

Πίνακας 5. Εξωγενή αντιοξειδωτικά

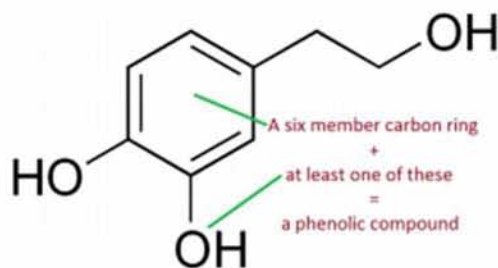
Εξωγενή αντιοξειδωτικά
Βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη)
Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)
Β-καροτένιο
Σελήνιο
Φλαβονοειδή
Ανθοκυανίνες
Φαινόλες

1.4 Φυτικές πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες αποτελούν μια ευρεία κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά (Bravo, 1998). Έως σήμερα είναι γνωστές πάνω από 8000 φαινολικές ενώσεις οι οποίες υπάρχουν ευρέως στο φυτικό βασίλειο. Οι φυτικές πολυφαινόλες συμμετέχουν στην άμυνα ενάντια στην υπερϊώδη ακτινοβολία αλλά και στο χρώμα των φυτών (Dai & Mumper, 2010). Πολυφαινόλες οι οποίες αποτελούν τα ενεργά συστατικά που υπάρχουν σε πολλά φαρμακευτικά φυτά, ρυθμίζουν τη δραστηριότητα πολλών ενζύμων και κυτταρικών υποδοχέων (Middleton, 2000). Έτσι οι πολυφαινόλες εκτός από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες παρουσιάζουν και διάφορες βιολογικές δράσεις (Mannach et al., 2004). Υπάρχουν σε όλα τα μέρη του φυτού, συνεπώς αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής. Οι φαινολικές ενώσεις είναι συστατικά που βρίσκονται σε πολλά φυτικά τρόφιμα όπως φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και στο ελαιόλαδο, αλλά και σε ροφήματα όπως το τσάι, το κρασί και ο καφές. Ακόμη οι φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για κάποιες από τις οργανοληπτικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων (Dai & Mumper, 2010).

1.4.1 Ταξινόμηση φυτικών πολυφαινολών

Οι φαινολικές ενώσεις είναι οι ενώσεις που περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, στους οποίους συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες (Dai & Mumper, 2010).



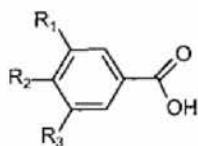
Εικόνα 6. Βασική δομή πολυφαινολών

Οι φυτικές πολυφαινόλες ταξινομούνται σε κατηγορίες. Αυτές είναι: φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια και λιγνάνια (Manach et al., 2004).

1.4.1.1 Φαινολικά οξέα

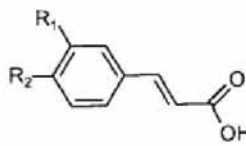
Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κινναμικού οξέος. Το υδροξυβενζοϊκό οξύ υπάρχει στα εδώδιμα φυτά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με εξαίρεση κάποια κόκκινα φρούτα. Επίσης το τσάι είναι μια σημαντική πηγή γαλλικού οξέος. Τα υδροξυκινναμικά οξέα, τα οποία βρίσκονται στα φυτά πιο συχνά από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, αποτελούνται από το καφεϊκό, φερουλικό, σιναιπικό και π-κουμαρικό οξύ. Αυτά τα οξέα σπάνια βρίσκονται στην ελεύθερη μορφή τους, με εξαίρεση στα επεξεργασμένα τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί ψύξη, αποστείρωση ή ζύμωση. Το καφεϊκό οξύ (στην ελεύθερη και εστεροποιημένη μορφή του) είναι το πιο άφθονο φαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75% με 100% του συνολικού υδροξυκινναμικού οξέος των περισσότερων φρούτων (Mannach et al., 2004).

Hydroxybenzoic acids



$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids

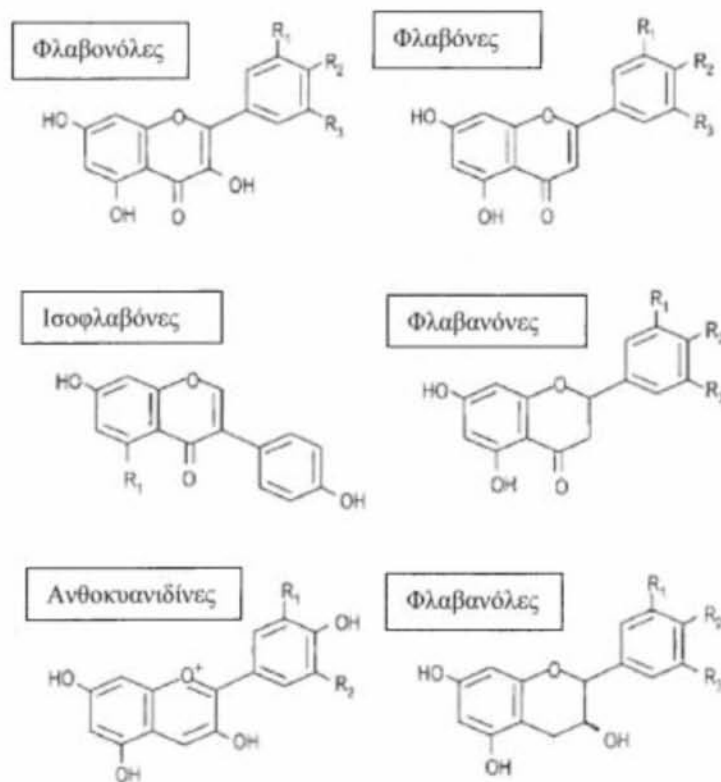


$R_1 = \text{OH}$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Caffeic acid
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$: Ferulic acid

1.4.1.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή μοιράζονται μια κοινή δομή που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα και σχηματίζουν έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο. Χωρίζονται σε φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόνες, ανθοκυανιδίνες, και φλαβανόλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες) ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του ετεροκυκλικού δακτυλίου (Dai & Mumper, 2010).

- Οι φλαβονόλες είναι τα πιο ευρέως διαδεδομένα φλαβονοειδή στα τρόφιμα. Μερικά τρόφιμα πλούσια σε φλαβονόλες είναι το κόκκινο κρασί, το τσάι και τα μύρτιλα.
- Οι φλαβόνες είναι λιγότερο κοινές συγκριτικά με τις φλαβονόλες στα φρούτα και λαχανικά. Πηγές φλαβονών είναι διάφορα δημητριακά.
- Οι φλαβονόνες υπάρχουν σε συγκεκριμένα αρωματικά φυτά, όπως η μέντα, αλλά βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις μόνο στα εσπεριδοειδή.
- Οι ισοφλαβόνες παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή τους με τα οιστρογόνα. Βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια και τη σόγια.
- Οι φλαβανόλες μπορεί να βρίσκονται είτε ως μονομερή (κατεχίνες), είτε ως πολυμερή (προανθοκυανιδίνες). Πηγές φλαβανολών είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα.
- Οι ανθοκυανιδίνες συμμετέχουν στο χρώμα των φυτών και των φρούτων. Πηγές ανθοκυανιδινών είναι το κόκκινο κρασί και κάποια δημητριακά (Mannach et al., 2004).



1.4.1.3 Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι μια κατηγορία πολυφαινολών που περιέχεται σε μικρά ποσοστά στα τρόφιμα. Το σημαντικότερο μέλος αυτής της ομάδας είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, η οποία βρίσκεται κυρίως στο κρασί και στον φλοιό των κόκκινων σταφυλιών. Στην ρεσβερατρόλη αποδίδεται αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση και θεωρείται καλός χημειοπροστατευτικός παράγοντας έναντι του καρκίνου (Bhat et al., 2002).

1.4.1.4 Λιγνάνια

Τα λιγνάνια αποτελούν μια ακόμη κατηγορία πολυφαινολών η οποία απαντάται σε μικρές ποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου. Ανήκουν στην ομάδα των φυτοοιστρογόνων. Τα κύρια φυτικά λιγνάνια είναι η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και η ματαιρεσινόλη και τα αντίστοιχα ζωικά παράγωγα είναι η εντεροδιόλη και η εντερολακτόνη. Κυριότερη πηγή λιγνανίων αποτελεί ο λιναρόσπορος, ενώ υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες στα ψυχανθή (φακές), στα δημητριακά (σιτάρι), στα λαχανικά (σπαράγγια, καρότα), και στα φρούτα (αχλάδια, δαμάσκηνα) (Manach et al., 2004). Μία από τις πιο γνώστες δράσεις τους είναι η αναστολή της καρκινογένεσης

προκαλούμενης από ορμόνη, διότι δρουν σαν οιστρογόνα ενώ εμφανίζουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Webb & Cullough, 2005).

1.5 *Salvia triloba*

Το φυτό *Salvia triloba*, κοινή ονομασία ελληνικό φασκόμηλο, ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae. Προέρχεται από τη Δαλματική ακτή και είναι ευρέως διαδεδομένο γύρω από τη Μεσόγειο Θάλασσα. Το φασκόμηλο θεωρούνταν ιερό βότανο από την αρχαιότητα. Το όνομά του *Salvia* προέρχεται από το Λατινικό «salvare» που μεταφράζεται ως σώζω. Διάφορα είδη φασκόμηλου χρησιμοποιούνται σε όλο τον κόσμο εδώ και εκατοντάδες χρόνια. Κατά τη Μεσαιωνική περίοδο το φασκόμηλο θεωρούνταν «πανάκεια» και καλλιεργούνταν στους κήπους των μοναστηριών. Παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον λόγω των χαμηλών επιπέδων κετονών που περιέχει, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα αν καταναλωθούν σε αυξημένα επίπεδα (καρδιακά προβλήματα, παράλυση). Ακόμη περιέχει φαινολικά οξέα και флаβονοειδή (El-Sayed et al., 2001). Το ελληνικό φασκόμηλο, καθώς και το αιθέριο έλαιο του έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιβακτηριδιακή δράση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία φλεγμονών του δέρματος και ως αντισηπτικό (Risaliti et al., 2019).



1.6 *Oropanax chironium*

Το φυτό *Oropanax chironium*, κοινή ονομασία Ηράκλειος, είναι ένα βότανο της οικογένειας *Ariaceae*. Αναπτύσσεται στα 1-3 μέτρα ύψος. Έχει οδοντωτά φύλλα με μακρύς μίσχους και μια μεγάλη κίτρινη ταξιανθία στην κορυφή των κλαδιών. Βρίσκεται κυρίως στη Δυτική Μεσόγειο. Οι σημαντικότερες ενώσεις που περιέχει είναι κουμαρίνες. Παρουσιάζει αντισπασμωδικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του άσθματος και για διαταραχές της εμμήνου ρήσεως (Maggio et al., 2013).



1.7 *Nigella sativa*

Το φυτό *Nigella sativa*, κοινή ονομασία Νιγέλα η εδάδιμος, είναι ένα ετήσιο ανθοφόρο φυτό της οικογένειας *Ranunculaceae*. Προέρχεται από τη Νότια Ευρώπη, τη Βόρεια Αφρική, τη Νότια Ασία και απαντάται συχνά στη Δύση. Φτάνει σε ύψος τα 20-30 cm. Τα λουλούδια του είναι λεπτά και έχουν λευκό χρώμα. Ο καρπός περιέχει πολλούς σπόρους που χρησιμοποιούνται ως μπαχαρικό. Έχει μελετηθεί εκτενώς για τις βιολογικές της ιδιότητες. Αποτελεί πλούσια πηγή πολυφαινόλων περιέχει κυρίως τα φλαβονοειδή κατεχίνη και επικατεχίνη (Benkaci-Ali et al., 2011). Έχει βρεθεί ότι προστατεύει από καρδιακή προσβολή, πολυομυελίτιδα και έχει αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αναλγητική και αντιμικροβιακή δράση. Επίσης, χρησιμοποιείται στη θεραπεία κατά του άσθματος (Ramadan, 2007).



1.8 *Nicotiana glauca*

Το φυτό *Nicotiana glauca*, κοινή ονομασία αγριοκαπνός, είναι δέντρο ή θάμνος με προέλευση τη Νότια Αμερική αλλά είναι ευρέως διαδεδομένο σε όλο το κόσμο. Έχει σωληνοειδή, κίτρινα άνθη, σε αραιές ταξιανθίες. Το φυτό χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς σκοπούς και για τη θεραπεία τραυμάτων. Περιέχει το τοξικό αλκαλοειδές αναβασίνη και κατάποση των φύλλων του φυτού μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Η αναβασίνη έχει παρόμοια δομή και ιδιότητες με τη νικοτίνη, αλλά είναι πιο δραστική στους ανθρώπους (Furer et al., 2011). Ακόμη έχει βρεθεί ότι περιέχει μεταβολίτες της βιταμίνης D3 (Skliar et al., 2000).



1.9 *Lysimachia vulgaris*

Το φυτό *Lysimachia vulgaris*, ελληνική ονομασία Λυσιμαχία η κοινή, ανήκει στην οικογένεια Primulaceae. Πήρε το όνομά του από το Λυσίμαχο, μακεδόνα στρατηγό του Μεγάλου Αλεξάνδρου. Είναι ένα είδος πολυετούς ανθοφορίας και βρίσκεται κυρίως σε δάση την νοτιοανατολικής Ευρώπης. Φτάνει σε ύψος το ένα μέτρο περίπου και έχει κίτρινα άνθη. Χρησιμοποιούνταν στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία του πυρετού, του έλκους στομάχου αλλά και ως αναλγητικό και αντιφλεγμονώδες. Μελέτες έχουν δείξει ότι τριτερπένια που περιέχει προκαλούν τοξικότητα σε μελανωματικά κύτταρα (Podolak et al., 1998). Επίσης, περιέχει μεγάλα ποσοστά υδροξυκιναμωμικού οξέος (Toth et al., 2012).



1.10 *Epilobium angustifolium*

Το φυτό *Epilobium angustifolium*, ελληνική ονομασία Επιλόβιο το στενόφυλλο, ανήκει στην οικογένεια Onagraceae. Είναι μια πολυετής πόα ύψους 60-160 cm με μεγάλα ροζ ή άσπρα άνθη. Περιέχει υψηλά επίπεδα πολυφαινολών. Φλαβονοειδή και τανίνες αποτελούν τα κύρια δραστικά συστατικά. Ακόμη περιέχει φαινολικά οξέα, κυρίως γαλλικό οξύ και το μεθυλεστέρα του. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα του *Epilobium angustifolium* παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων μεταξύ των οποίων αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριδιακή δράση και αντιγηραντικές ιδιότητες (Schepetkin et al., 2016).



1.11 *Atropa belladonna*

Το φυτό *Atropa belladonna*, ελληνική ονομασία Άτροπος η ευθάλεια, γνωστή και ως μπελαντόνα ανήκει στην οικογένεια των Solanaceae. Πήρε το όνομά του από την Άτροπο, μία από τις τρεις μοίρες της Ελληνικής μυθολογίας. Είναι ένα πολυετές ποώδες φυτό το οποίο είναι ιθαγενές στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αφρική και τη Δυτική Ασία. Τα άνθη του έχουν θαμπό μωβ χρώμα και οι καρποί του είναι γυαλιστεροί μαύροι. Είναι ένα από τα πιο τοξικά φυτά που απαντώνται στο ανατολικό ημισφαίριο και θεωρείται ισχυρό δηλητήριο. Στην παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιείται ανά τους αιώνες ως παυσίπονο, χαλαρωτικό μυών και αντιφλεγμονώδες. Παρουσιάζει λίγες θεραπευτικές δράσεις. Η πιο διαδεδομένη είναι ως αντίδοτο σε δηλητηριάσεις από χολινεργικούς παράγοντες. Ο λόγος της συγκεκριμένης δράσης είναι η παρουσία στο φυτό αλκαλοειδών τροπανίου: της ατροπίνης και της σκοπολαμίνης. Ακόμη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως αναλγητικό (Maqbool et al., 2014, Berdai et al., 2012).



1.12 *Ailanthus altissima*

Το φυτό *Ailanthus altissima*, ελληνική ονομασία Αείλανθος ο υψηλότετος, ανήκει στην οικογένεια των Simarubaceae. Είναι ιθαγενές της Κίνας, της Ταϊβάν και της Βόρειας Κορέας, όμως υπάρχει στις περισσότερες χώρες της λεκάνης της Μεσογείου. Είναι φυλλοβόλο δέντρο και μπορεί να φτάσει τα 27 m σε ύψος. Αναπτύσσει ταξιανθίες από μικρά άνθη κιτρινοπράσινου ως κοκκινωπού χρώματος. Περιέχει πληθώρα φαινολικών ενώσεων και είναι πλούσιο σε υδροξυκιναμμωμικά οξέα. Λόγω των πολυφαινολών που περιέχει παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση (Luis et al., 2012).



1.13 *Inula oxylepsis*

Το φυτό *Inula oxylepsis* ανήκει στην οικογένεια Asteraceae. Βρίσκεται στην Κίνα, την Αφρική και στην Ευρώπη, κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου. Ανήκει στην οικογένεια των αγγειόσπερμων. Από την αρχαιότητα θεωρούνταν ως πανάκεια για την αντιμετώπιση μεγάλου εύρους ασθενειών όπως το άσθμα, το κοινό κρυολόγημα και οι ψυχολογικές διαταραχές. Ερευνητικές μελέτες παρουσιάζουν ότι έχει αντιφλεμονώδεις, αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές ιδιότητες. Είναι πλούσιο σε τερπένια και φλαβονοειδή (Τσομώκου, 2015).



2.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από διάφορα είδη αρωματικών φυτών. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS. Επίσης, προσδιορίστηκε το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών: τα H₂O₂ (υπεροξείδιο του υδρογόνου), αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, ρίζα DPPH και το ένζυμο HRP ήταν της εταιρίας Merck (Γερμανία). Το γαλλικό οξύ (gallic acid), το άνυδρο ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃) και το ABTS ήταν της εταιρείας Alpha Aesar (Γερμανία).

3.2. Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα τα οποία μελετήθηκαν απομονώθηκαν από τα φυτά *Ailanthus altissima* (οικογένεια Simarubaceae), *Atropos belladonna* (οικογένεια Solanaceae), *Epilobium angustifolium* (οικογένεια Onagraceae), *Inula oxylepis* (οικογένεια Asteraceae), *Lysimachia vulgaris* (οικογένεια Primulaceae), *Nicotiana glauca* (οικογένεια Solanaceae), *Nigela sativa* (οικογένεια Ranunculaceae), *Oropanax chironium* (οικογένεια Apiaceae) και *Salvia triloba* (οικογένεια Lamiaceae). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανόλη και νερό. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Πίνακας 6. Λίστα φυτικών εκχυλισμάτων

Φυτό	Διαλύτης	Κωδικός
<i>Ailanthus altissima</i>	Μεθανόλη	87 Exc
<i>Atropos belladonna</i>	Μεθανόλη	80 Exc
<i>Epilobium angustifolium</i>	Μεθανόλη	81 Exc
<i>Inula oxylepis</i>	Μεθανόλη	77 Exc
<i>Lysimachia vulgaris</i>	Μεθανόλη	86 Exc
<i>Nicotiana glauca</i>	Μεθανόλη	59 Exc
<i>Nigela sativa</i>	Μεθανόλη	54 Exc
<i>Oropanax chironium</i>	Νερό	91 Exd
<i>Salvia triloba</i>	Νερό	128 Exd

3.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH

Η μέθοδος ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH[•] μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η ρίζα DPPH[•] είναι μία σταθερή ρίζα, έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μια μεταβολή που είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.

3.3.1. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH[•] την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στα οποία εμπεριέχονται 50 μM ρίζας DPPH[•]) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, στη συνέχεια η μεθανόλη και το H₂O και τέλος το διάλυμα της ρίζας, με σταθερό γρήγορο ρυθμό. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται η σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 7. Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C₁	C₂	C₃	C₄	C₅	C₆
Εκχύλισμα	-	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Μεθανόλη	900μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl
H₂O	100μl	100μl	-	-	-	-	-	-
DPPH[•]	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Τελικός Όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας των 20 λεπτών ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου γίνεται με το τυφλό. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (100μl εκχυλίσματος σε 900μl μεθανόλη). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα.

3.3.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας – Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_\delta) / A_0] \times 100$$

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_δ: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλείται μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%. Ο υπολογισμός του IC₅₀ πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Graphpad Prism 6. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonicacid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS^{•+}, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Prior et al., 2005, Miller et al., 1993).

3.4.1. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

- Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) παρασκευάζεται διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζονται 10.97 mg ABTS και διαλύονται σε H₂O.
- Διάλυμα H₂O₂ (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H₂O₂ 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) παρασκευάζεται διάλυμα 600 μM. Από το stock διάλυμα H₂O₂ 30% 8,8 M πραγματοποιείται αραίωση με H₂O, ώστε να παρασκευαστεί το διάλυμα των 600 μM.

- Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύεται 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια αραίωση 1/10 και χρησιμοποιείται αυτό το διάλυμα για την αντίδραση. Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8. Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C₁	C₂	C₃	C₄	C₅	C₆
H₂O	550μl	500μl	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl
ABTS	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl
H₂O₂	100μl	50μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
HRP	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Τελικός Όγκος	1000 μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl
Εκχύλισμα	-	-		100μl	100μl	100μl	100μl	100μl

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε εκχύλισμα. Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

3.4.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας – Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας ABTS^{•+} και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_δ: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (εκχύλισμα).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS^{•+} κατά 50%. Ο υπολογισμός του IC₅₀ πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Graphpad Prism 6. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3.5. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (Total Polyphenolic Content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Το ολικό περιεχόμενο πολυφαινολών των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου χαρακτηριστικού μπλε χρώματος που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃), αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και του προϊόντος της αντίδρασης.

3.5.1. Πειραματική διαδικασία

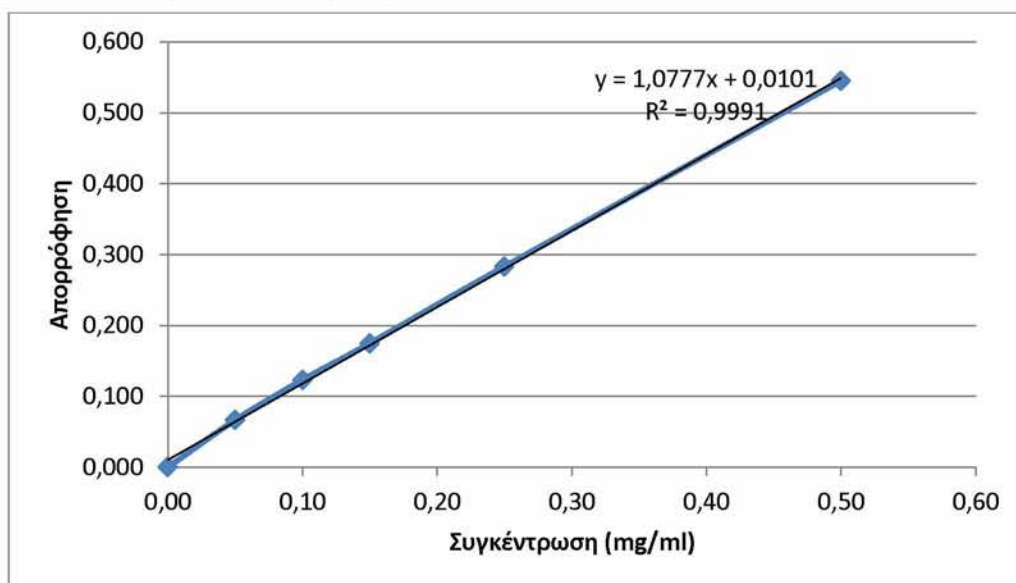
Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) την ημέρα του πειράματος. Στη συνέχεια σε eppendorf tubes προστίθενται διαδοχικά νερό, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και το εκχύλισμα. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9. Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Negative control	C ₁
H ₂ O	1,02ml	1,1ml	1ml
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	100μl	-	100μl
Εκχύλισμα	-	20μl	20μl

Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε μίγμα προστίθενται 280μl Na₂CO₃ (25% w/v) και 600μl απιονισμένο νερό και ακολουθεί ανάδευση με vortex. Μετά από 1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, μετράται η απορρόφηση στα 765nm (Priftis et al., 2015).

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται μέσω πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,15, 0,25, 0,5, mg/ml γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 1,0777x + 0,0101$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman $R^2 = 0,9991$. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.

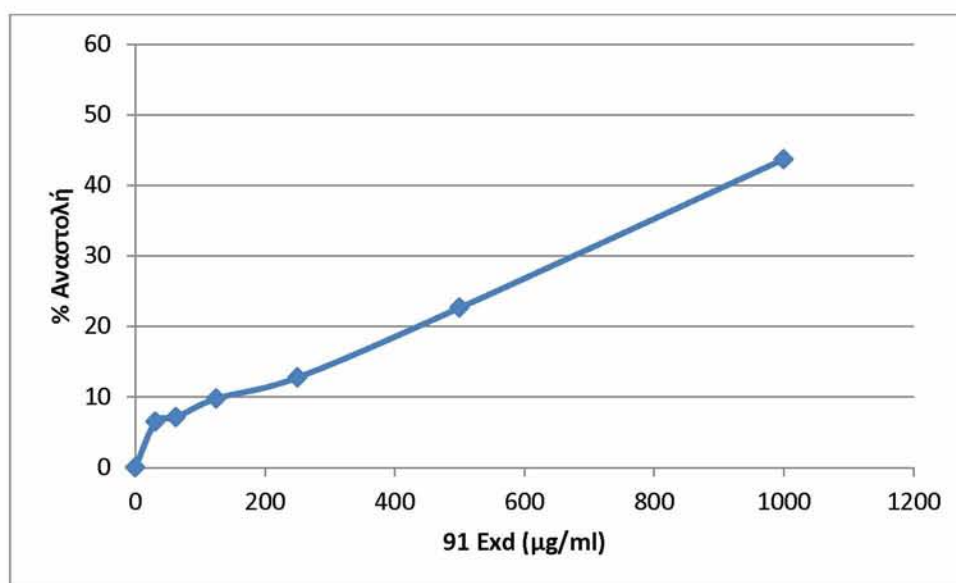


Διάγραμμα 3.5.1 Το διάγραμμα απεικονίζει την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

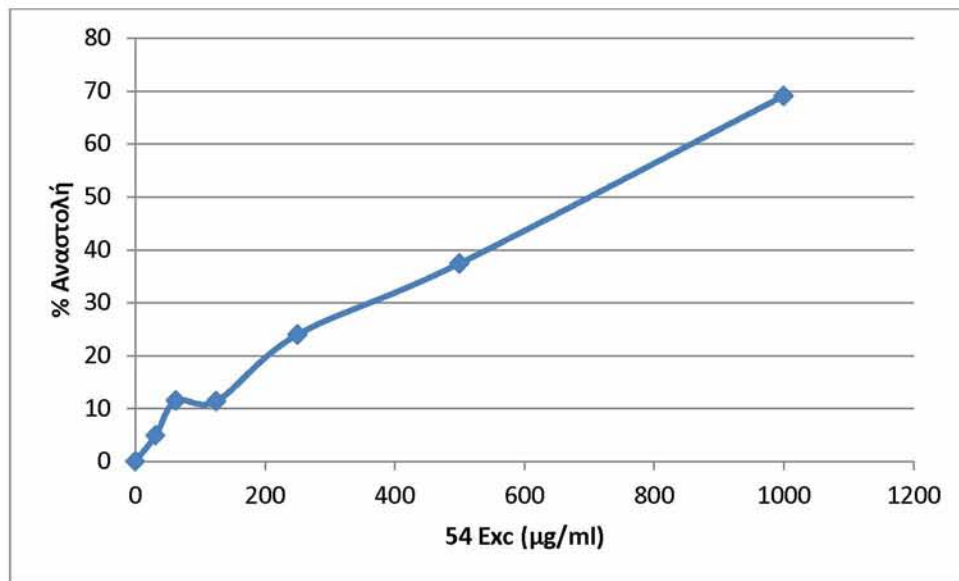
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH

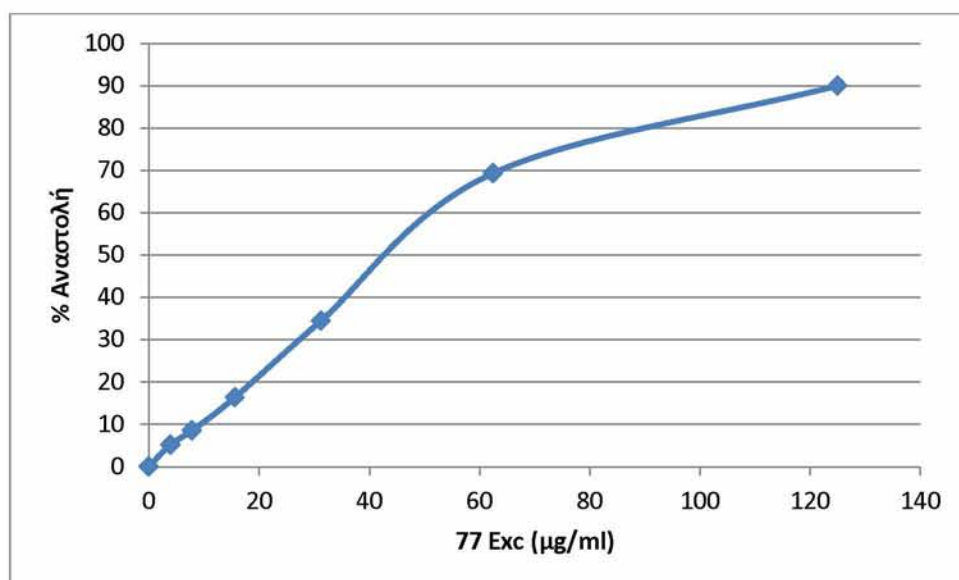
Συνολικά μετρήθηκαν 9 εκχυλίσματα και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από 2 – 1000 $\mu\text{g/ml}$. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξερτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 517 nm, γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC_{50} των εκχυλισμάτων φαίνονται στο διάγραμμα 4.1.10. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} , τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC_{50} , κυμαίνονται από 14,6 $\mu\text{g/ml}$ έως 624,2 $\mu\text{g/ml}$. Πιο συγκεκριμένα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η παρακάτω: 81 Exc > 86 Exc > 87 Exc > 128 Exd > 59 Exc > 77 Exc > 80 Exc > 54 Exc. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι το εκχύλισμα 91 Exd δεν σημείωσε αναστολή της ρίζας DPPH κατά 50%, ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση.



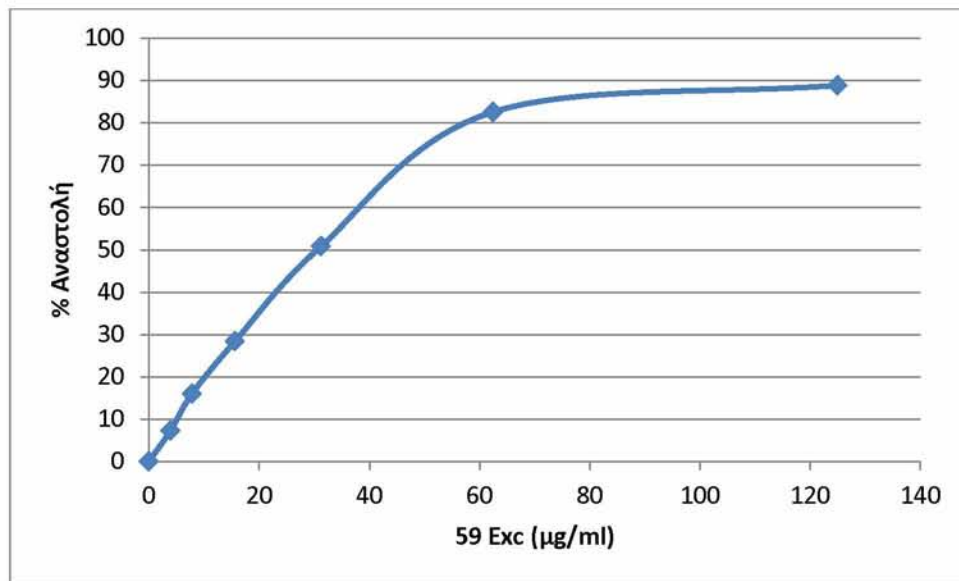
Διάγραμμα 4.1.1 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 91 Exd



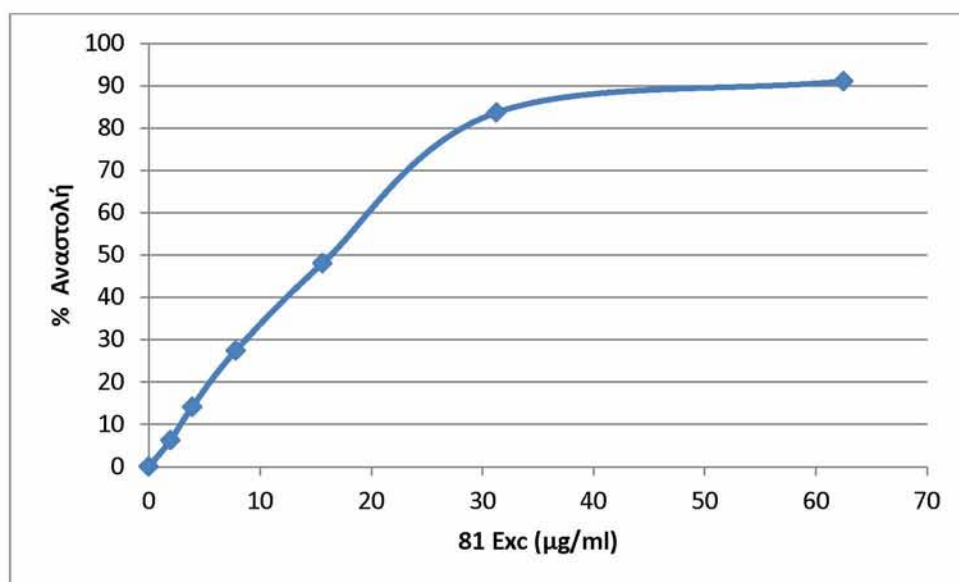
Διάγραμμα 4.1.2 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 54 Exc



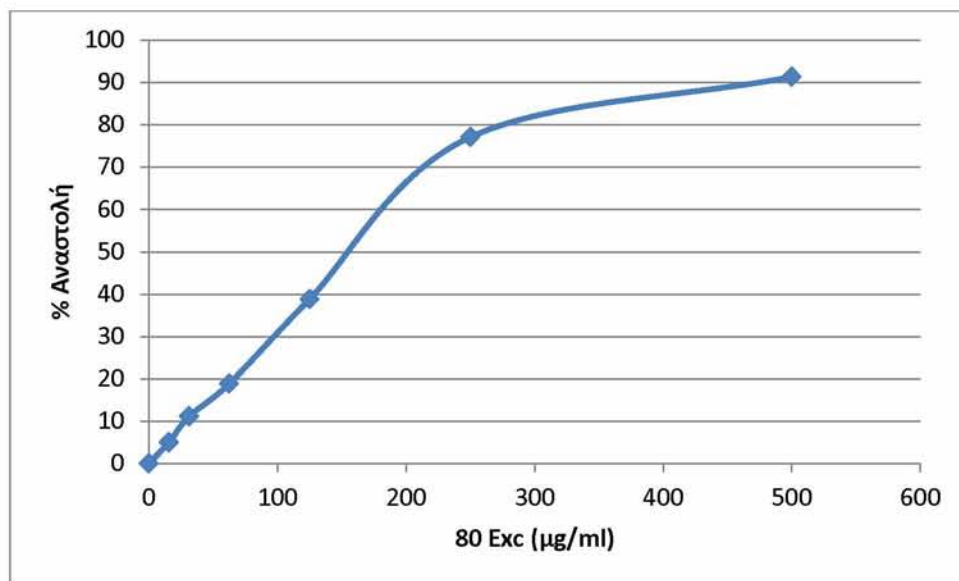
Διάγραμμα 4.1.3 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 77 Exc



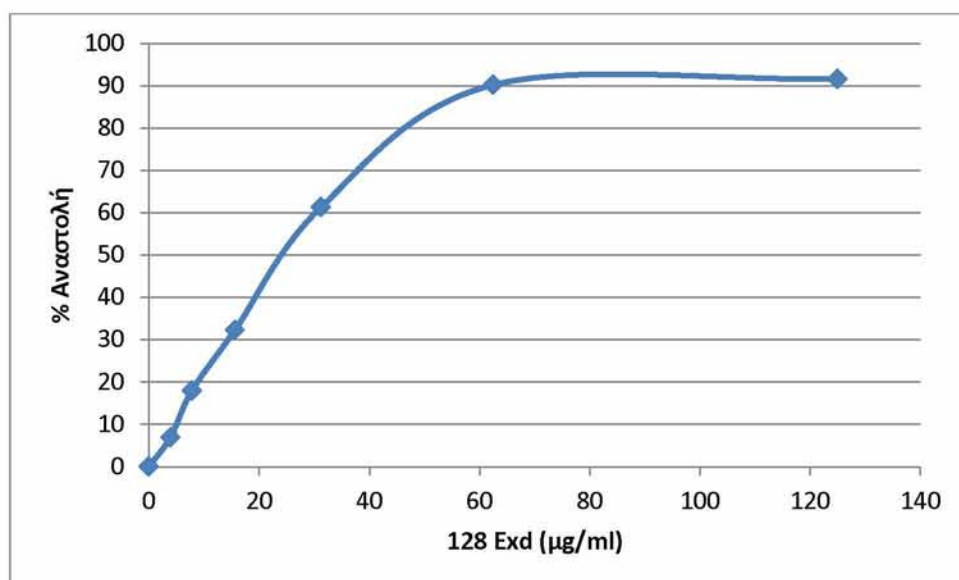
Διάγραμμα 4.1.4 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 59 Exc



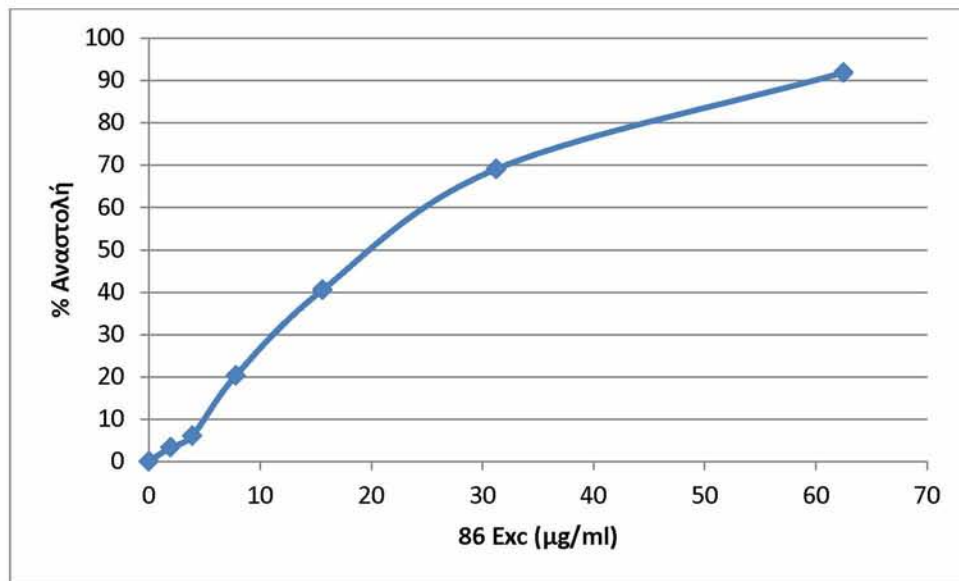
Διάγραμμα 4.1.5 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 81 Exc



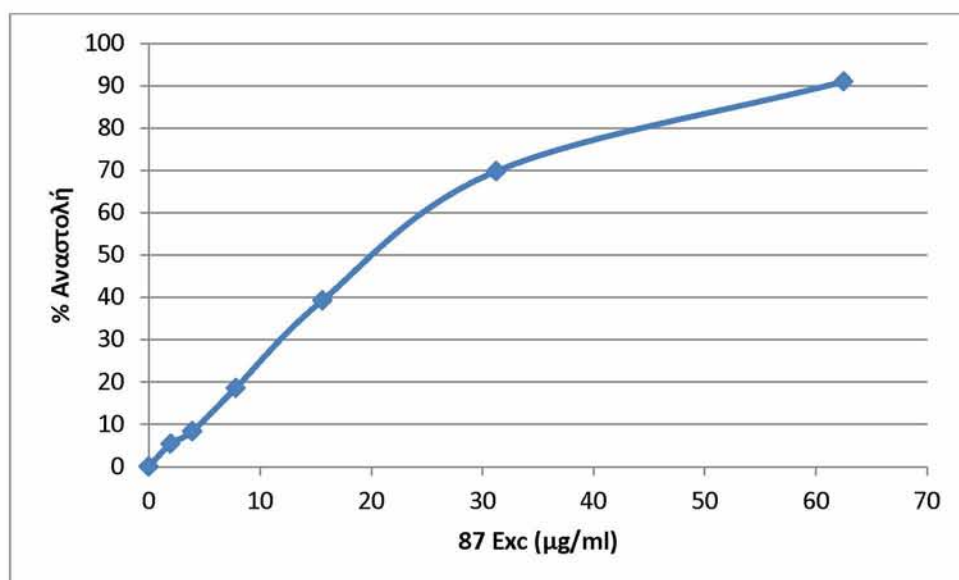
Διάγραμμα 4.1.6 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 80 Exc



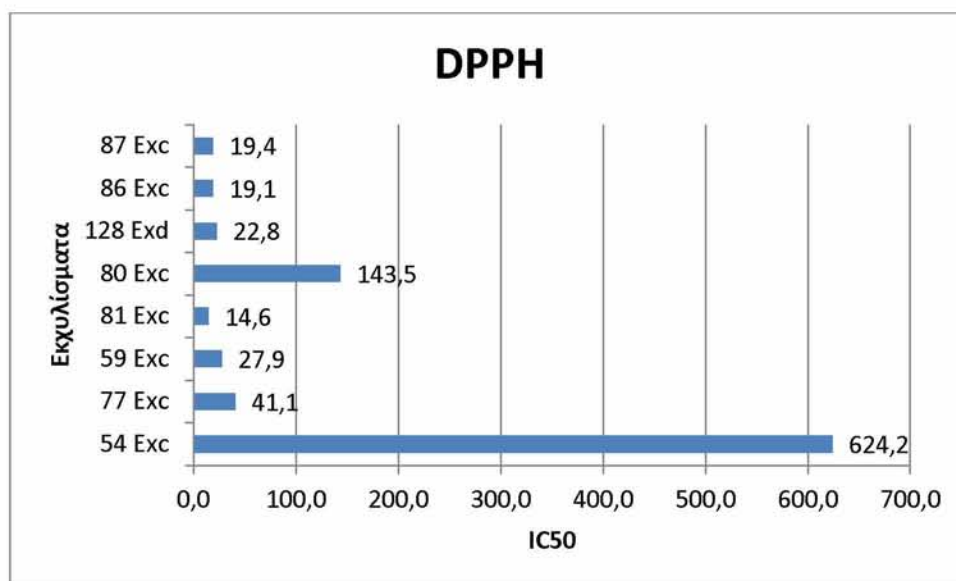
Διάγραμμα 4.1.7 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 128 Exd



Διάγραμμα 4.1.8 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 86 Exc



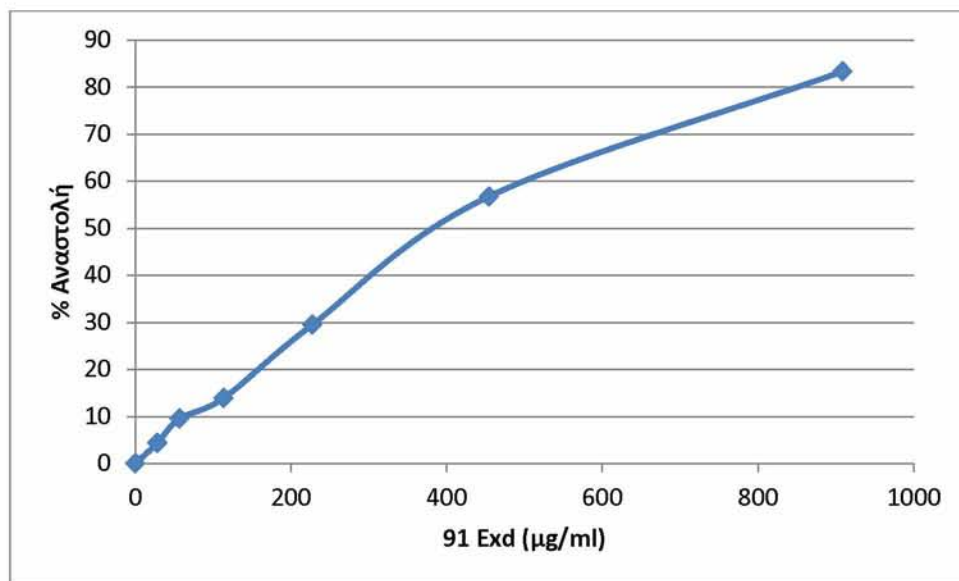
Διάγραμμα 4.1.9 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα 87 Exc



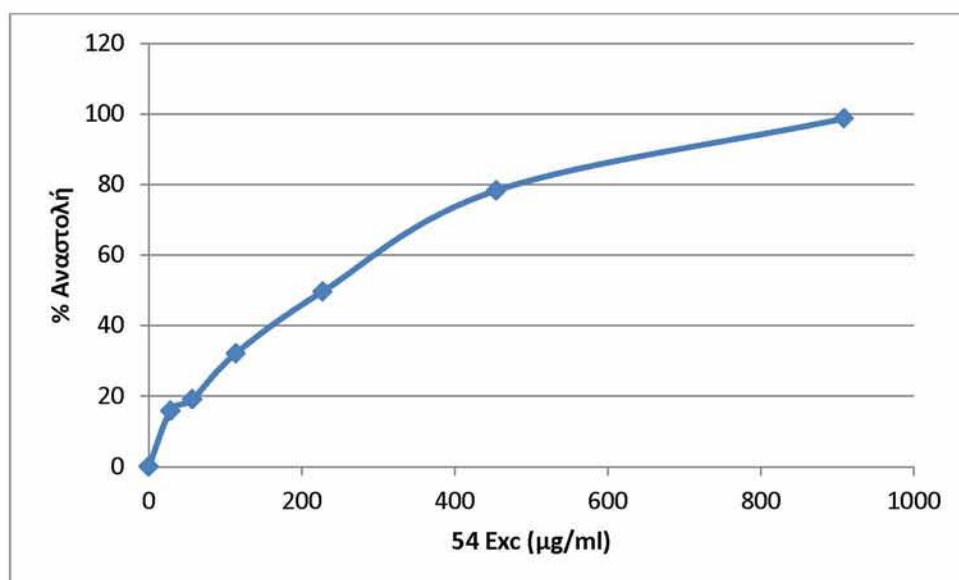
Διάγραμμα 4.1.10 Απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} που προκύπτουν από την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από τα φυτικά εκχυλίσματα

4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS

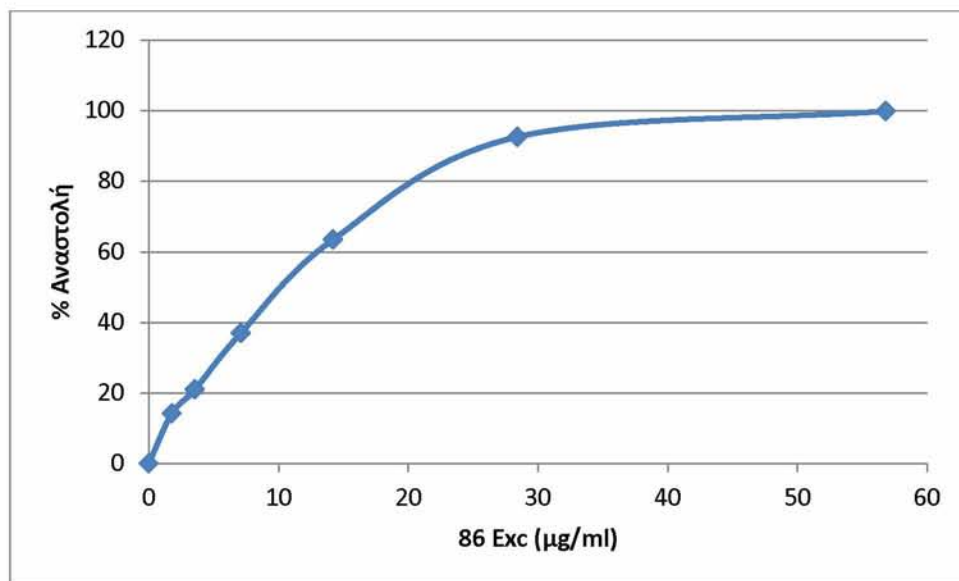
Συνολικά μελετήθηκαν 9 εκχυλίσματα και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από 2 – 909 $\mu\text{g/ml}$. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος ABTS στα 730 nm, γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS και ως συνέπεια σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα.. Οι τιμές των IC_{50} των εκχυλισμάτων φαίνονται στο διάγραμμα 4.2.10. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} , τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτικού εκχυλίσματος. Οι τιμές IC_{50} κυμαίνονται από 7,4 $\mu\text{g/ml}$ – 370,7 $\mu\text{g/ml}$. Πιο συγκεκριμένα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η παρακάτω: 81 Exc > 86 Exc > 87 Exc > 59 Exc > 128 Exd > 77 Exc > 80 Exc > 54 Exc > 91 Exc.



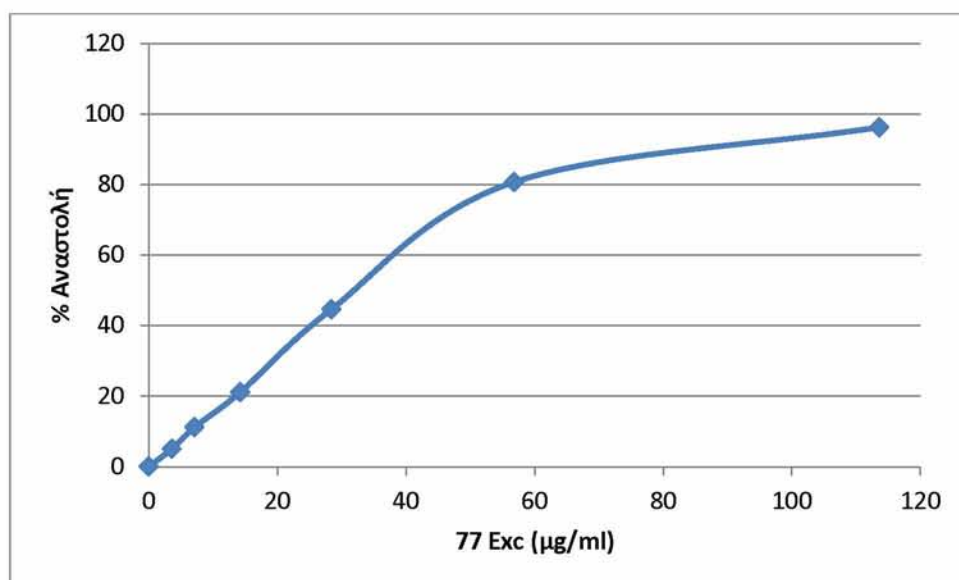
Διάγραμμα 4.2.1 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 91 Exd



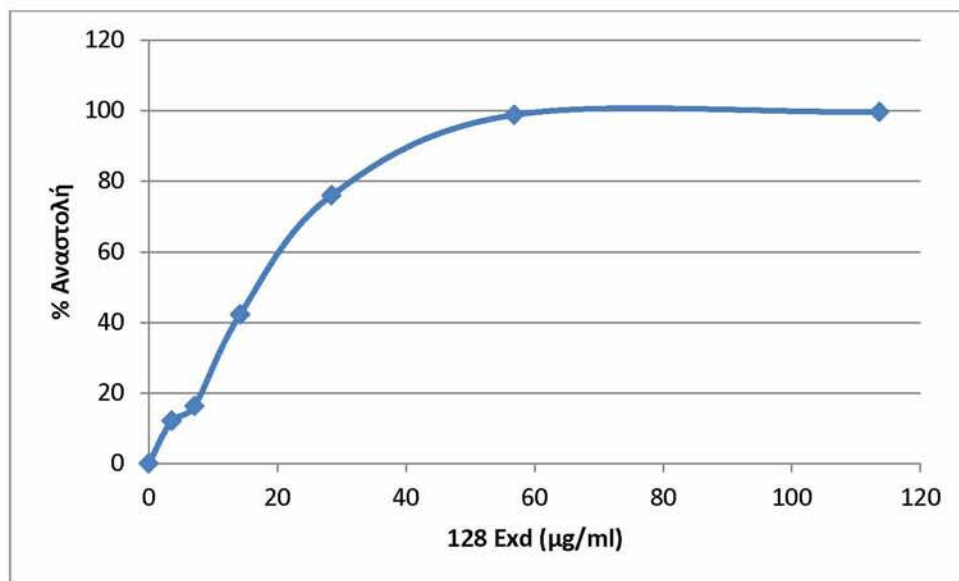
Διάγραμμα 4.2.2 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 54 Exc



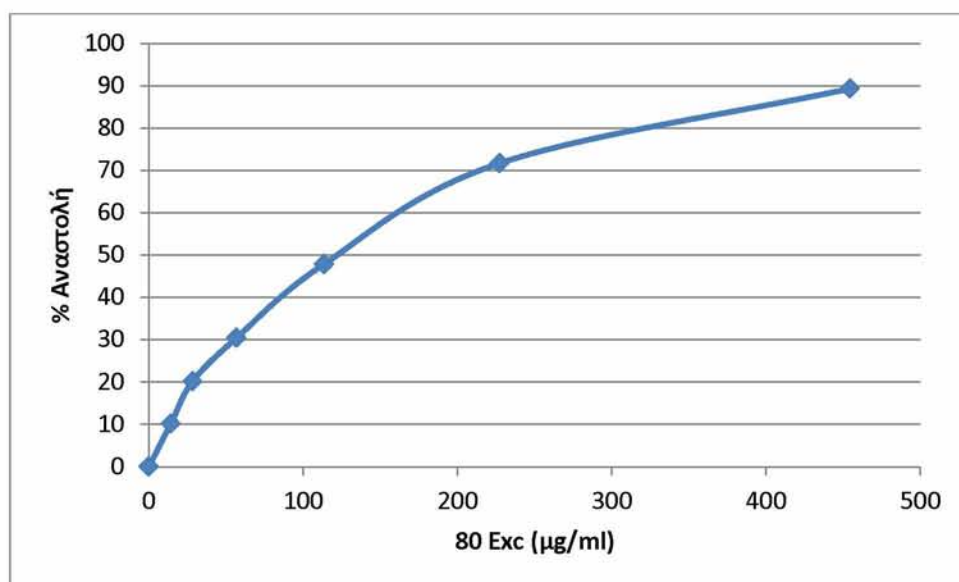
Διάγραμμα 4.2.3 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 86 Exc



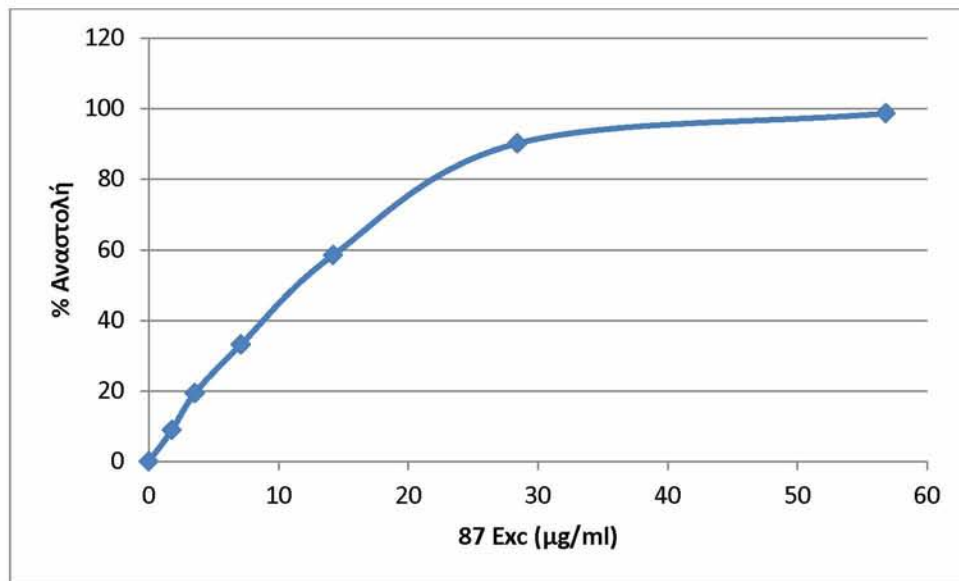
Διάγραμμα 4.2.4 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 77 Exc



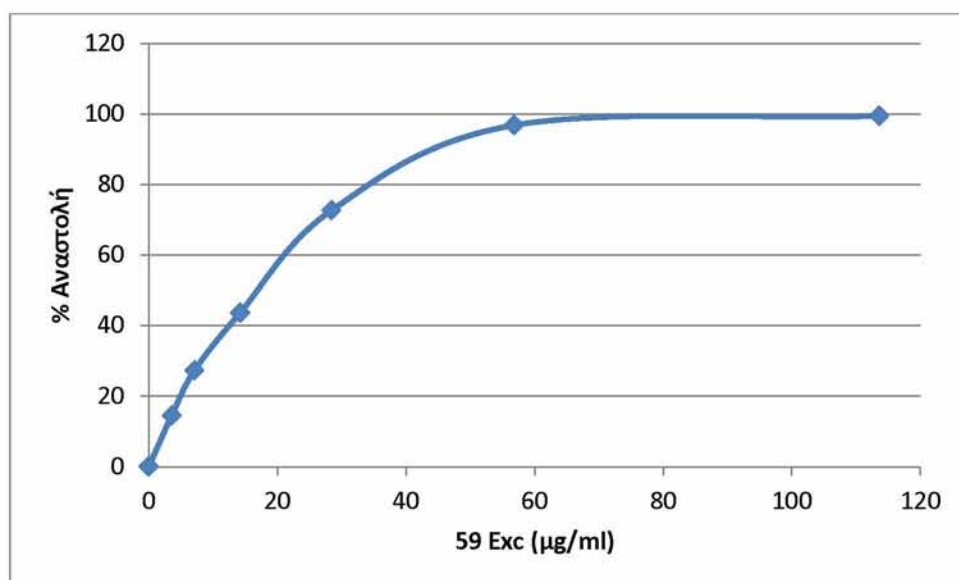
Διάγραμμα 4.2.5 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 128 Exd



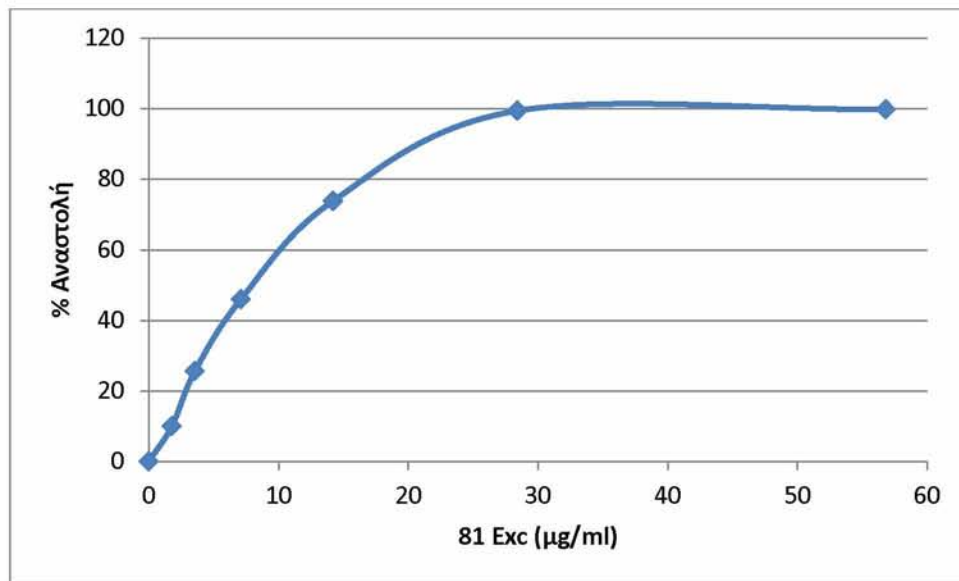
Διάγραμμα 4.2.6 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 80 Exc



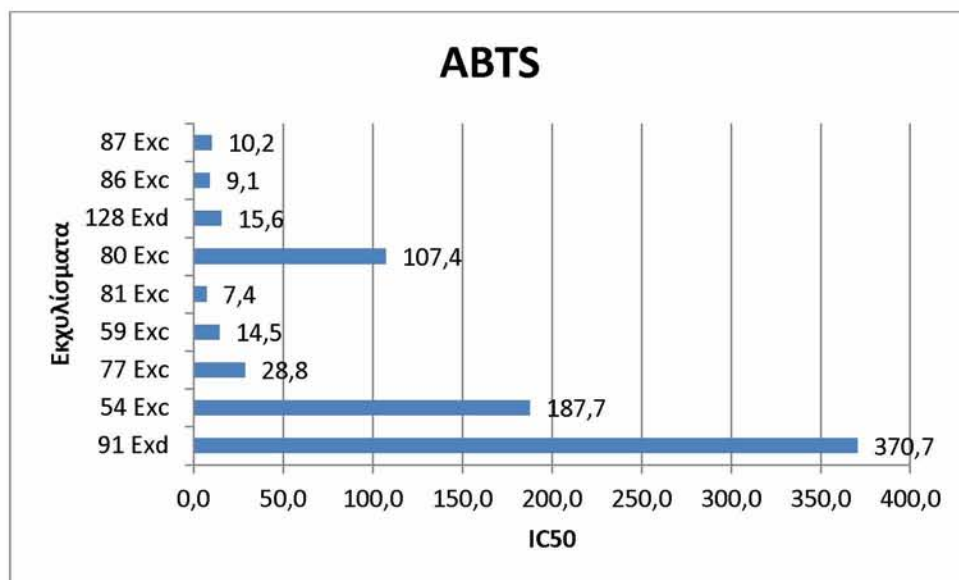
Διάγραμμα 4.2.7 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 87 Exc



Διάγραμμα 4.2.8 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 59 Exc



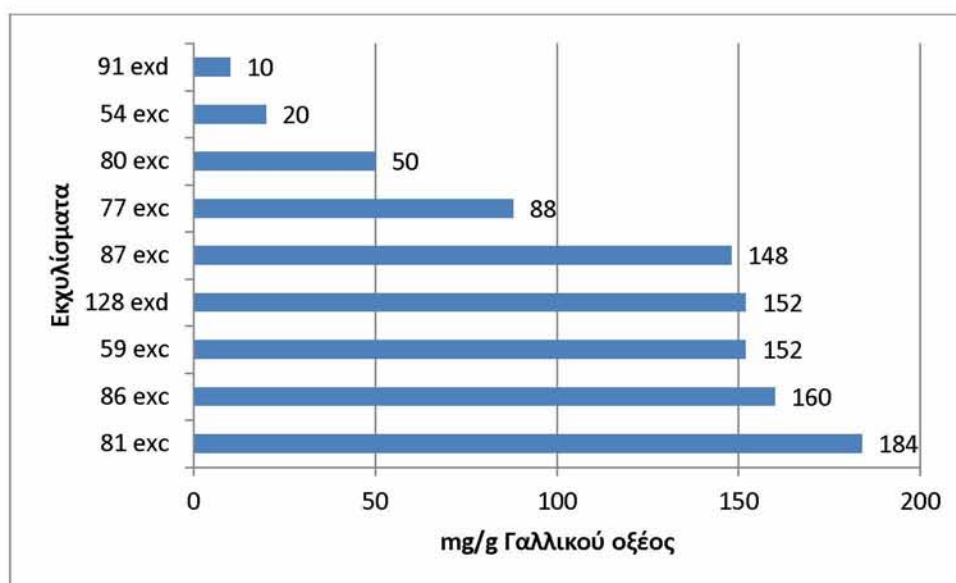
Διάγραμμα 4.2.9 Εξουδετέρωση (% αναστολή) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα 81 Exc



Διάγραμμα 4.2.10 Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ που προκύπτουν από την εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από τα φυτικά εκχυλίσματα

4.3 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

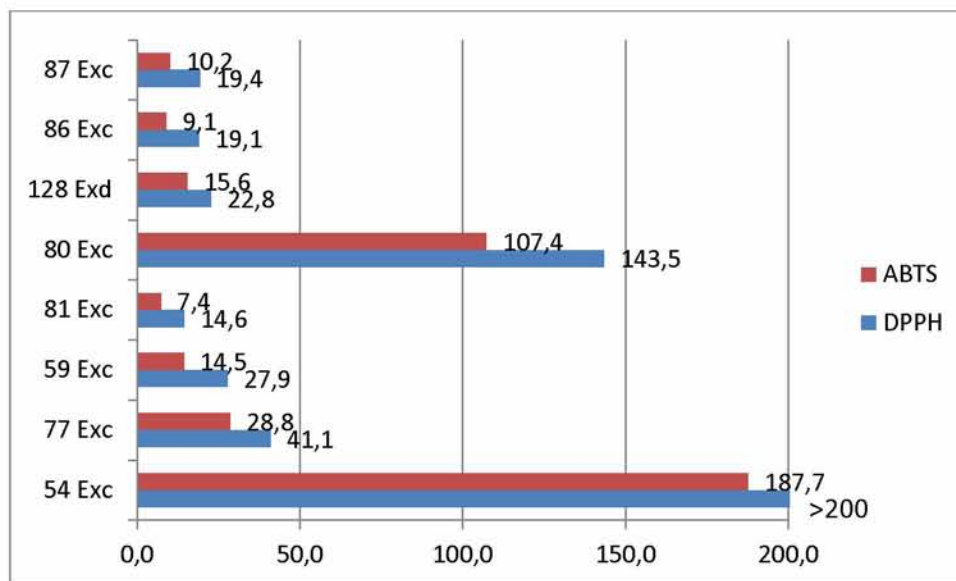
Συνολικά μετρήθηκαν 9 εκχυλίσματα για την ποσοτικοποίηση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (Total Polyphenolic Content, TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Υψηλότερες τιμές παρουσιάζει το εκχύλισμα 81 Exc, στη συνέχεια ακολουθούν τα εκχυλίσματα 86 Exc, 59 Exc, 128 Exd, 87 Exc, 77 Exc, 80 Exc. Ιδιαίτερα χαμηλές τιμές στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα 91 Exd και 54 Exc.



Διάγραμμα 4.3.1 Τιμές TPC των εκχυλισμάτων

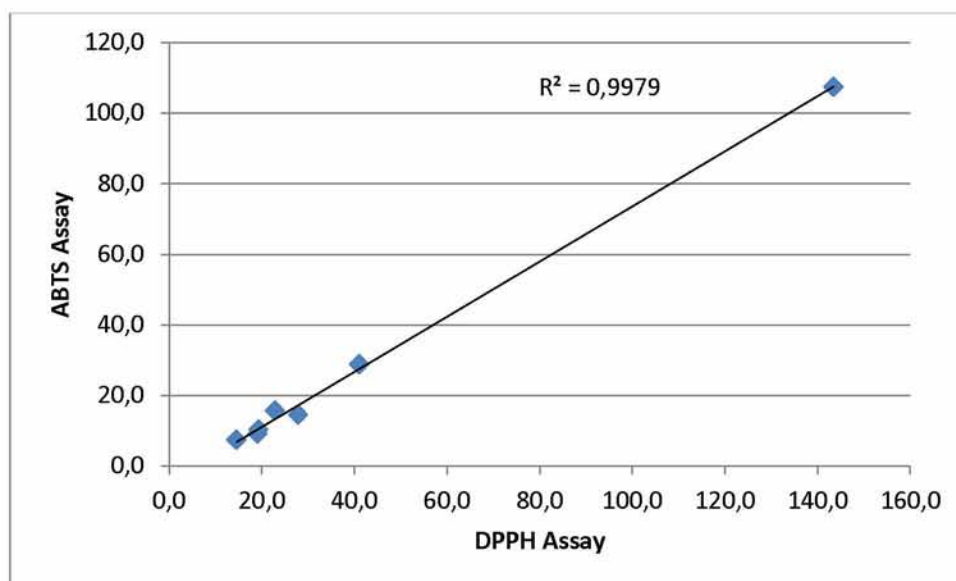
4.4 Συνολικά αποτελέσματα

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρώντας το Διάγραμμα 4.4.1 διαπιστώνουμε ότι όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν χαμηλότερο IC₅₀ με τη μέθοδο ABTS. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι είναι πιο δραστικές οι υδατοδιαλυτές ενώσεις που υπάρχουν σε κάθε εκχύλισμα.



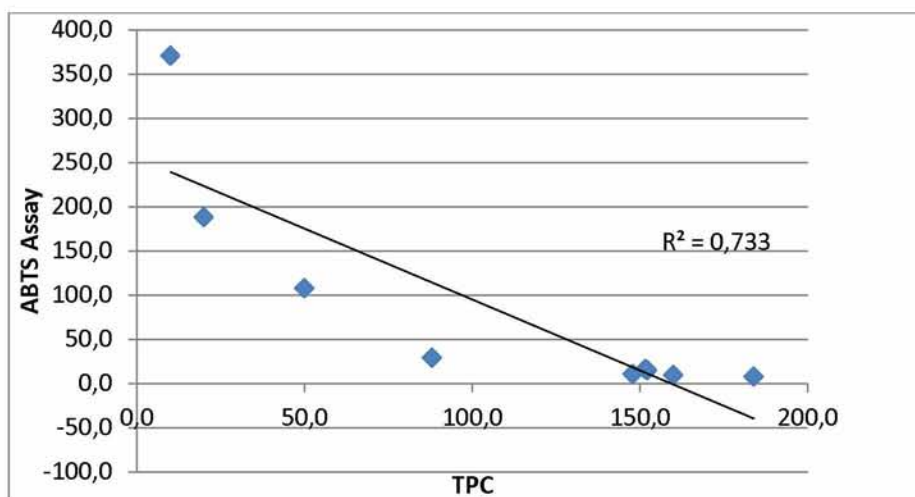
Διάγραμμα 4.4.1 Απεικόνιση των τιμών IC₅₀ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους.

Παρατηρώντας το διάγραμμα 4.4.2 φαίνεται ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. δηλαδή οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται σε συμφωνία όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.



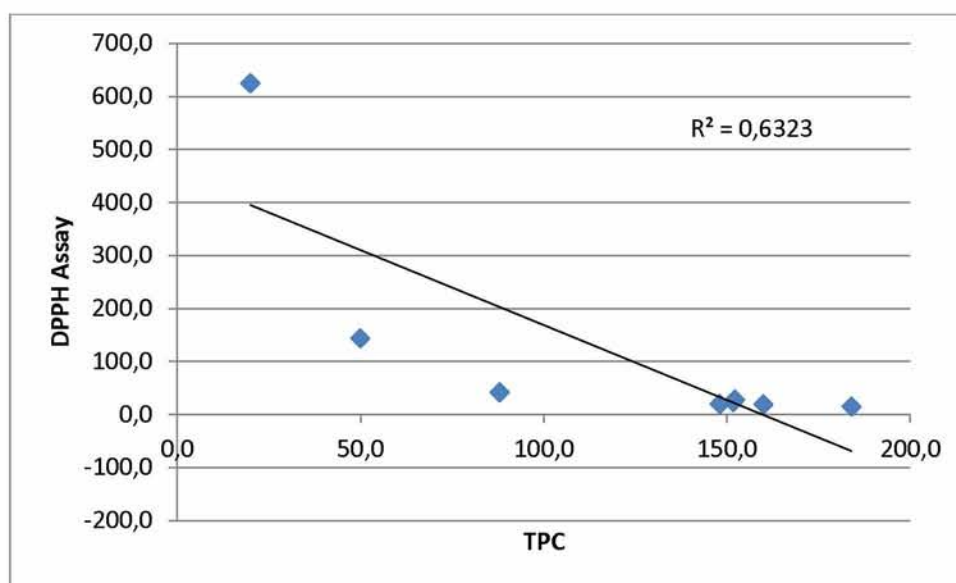
Διάγραμμα 4.4.2 Σύγκριση των μεθόδων ABTS και DPPH

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 4.4.3 υπάρχει μια ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της μεθόδου ABTS και του Ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου.



Διάγραμμα 4.4.3 Σύγκριση της μεθόδου ABTS με το Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο

Παρατηρώντας το παρακάτω διάγραμμα υπάρχει μια ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της μεθόδου DPPH και του Ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου.



Διάγραμμα 4.4.4 Σύγκριση της μεθόδου DPPH με το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο

Όσον αφορά τη συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης με το πολυφαινολικό περιεχόμενο το εκχύλισμα με την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση παρουσίασε και το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι στην αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται από την ποσοτική σύσταση των πολυφαινολών.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, κυρίως λόγω την αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν και τη συμβολή τους στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από διάφορα είδη αρωματικών φυτών. Τα φυτά αυτά είναι *Ailanthus altissima*, *Atropa belladonna*, *Epilobium angustifolium*, *Inula oxylepis*, *Lysimachia vulgaris*, *Nicotiana glauca*, *Nigela sativa*, *Oropanax chironium* και *Salvia triloba*.

Με βάση τις τιμές IC_{50} , από τα 9 εκχυλίσματα τα 8 παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH, τα περισσότερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Το εκχύλισμα *Oropanax chironium* (91 Exd) δεν παρουσίασε σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και δεν κατάφερε να αναστείλει τη ρίζα DPPH κατά 50%, ούτε στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (1000 μg/ml). Το εύρος των τιμών IC_{50} για τα 8 εκχυλίσματα κυμάνθηκε από 14,6 μg/ml έως 624,2 μg/ml. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το *Epilobium angustifolium* (81 Exc) με τιμή IC_{50} 14,6 μg/ml και το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του *Nigela sativa* (54 Exc) με τιμή IC_{50} 624,2 μg/ml.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ABTS έδειξε ότι όλα τα φυτικά εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS, τα περισσότερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμάνθηκε από 7,4 μg/ml έως 370,7 μg/ml. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν του *Epilobium angustifolium* (81 Exc) με IC_{50} 7,4 μg/ml και πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του *Oropanax chironium* (91 Exd) με τιμή IC_{50} 370,7 μg/ml. Ακόμη παρατηρείται ότι οι μέθοδοι ABTS και DPPH βρίσκονται σε συμφωνία όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, διότι παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Αυτό σημαίνει ότι οι ίδιες βιοδραστικές ουσίες είναι υπεύθυνες για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών.

Από την ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών των φυτικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν του *Epilobium angustifolium* (81 Exc) με τιμή 184 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας και το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα *Oropanax chironium* (91 Exd) με 10 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας. Τα αποτελέσματα που βρέθηκαν είναι σε

συμφωνία με τα αποτελέσματα των μεθόδων DPPH και ABTS, γιατί υπάρχει μια ικανοποιητική συσχέτιση των δύο μεθόδων με το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο. Δηλαδή το εκχύλισμα με την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση παρουσίασε και το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα περισσότερα φυτικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Το εκχύλισμα *Epilobium angustifolium* παρουσίασε την υψηλότερη *in vitro* αντιοξειδωτική δράση με όλες τις τεχνικές που εξετάστηκε. Είναι αναγκαίο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα συστατικά του φυτικού εκχυλίσματος, για να πραγματοποιηθεί επιπλέον έρευνα για τα βιοδραστικά συστατικά του. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσαν να παραχθούν καινοτόμα προϊόντα, όπως φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά και συμπληρώματα διατροφής.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ames, B. N. (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in Clinical and Biological Research*, 206, 3–32.
- Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, 2012, 137-289.
- Benkasi-Ali, F., Baaliouamer, A., Wathelet, J.P., Marlier, M. (2012). Chemical composition and physicochemical characteristics of fixed oils from Algerian *Nigella sativa* seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 47.
- Berdai, M.A., Labib, S., Chetouani, K., Harandou, M. (2012). Atropa Belladonna intoxication: a case report. *Pan African Medical Journal – ISSN: 1937- 8688*.
- Bhat, K.P., Pezzuto, J.M. (2002). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 957:210–229.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28:25-30.
- Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 280–285.
- Dai, J., Mumper, R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
- Elsayed, N. M., Omaye, S. T., Klain, G. J., & Korte, D. W. J. (1992). Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology*, 72(2), 153–165.
- El-Sayed, N.H., Khalifa, T.I., Ibrahim, M.T., Mabry, T.J., (2001). Constituents from *Salvia triloba*. *Fitoterapia* 72 850-853.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 36(4), 327–358.
- Furer, V., Hersch, M., Silvetzki, N., Breuer, G.S., Zevin, S., (2011). *Nicotiana glauca* (Tree Tobacco) intoxication-two cases in one family. *J. Med. Toxicol.* 7:47–51 .
- Halliwell, B. (2001). “Free Radicals and other reactive species in Disease”, National University of Singapore.

- Halliwell, B, Gutteridge, J.M.C.(1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN, Methods in Enzymology 186.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Knight, J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. Annals of Clinical and Laboratory Science, 30(2), 145–158.
- Koren, H. S. (1995). Associations between criteria air pollutants and asthma. Environmental Health Perspectives, 103 Suppl, 235–242.
- Leaf, D. A., Kleinman, M. T., Hamilton, M., & Barstow, T. J. (1997). The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. Medicine and Science in Sports and Exercise.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews.
- Luis, A., Gil, N., Amaral, M.E., Dominues, F., Duarte, A.P. (2012). Ailanthus altissima swingle: a source of bioactive compounds with antioxidant activity. Bioresources 7(2), 2105-2120.
- Maggio, A., Bruno, M., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F. (2013). Chemical composition of the essential oils of three species of Apiaceae growing wild in Sicily: Bonannia graeca, Eryngium maritimum and Opopanax chironium. Natural Product Communications Vol. 8.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr; 79:727–47.
- Marqbool, F., Singh, S., Kaloo, Z.A., Jan, M. (2014). Medicinal importance of genus Atropa Royle -A review. International Journal of Advanced Research, Volume 2, Issue 2, 48-54.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C.(2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 52:673–751.
- Mylonas, C., Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., & Kondo, M. (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. Digestive Diseases and Sciences, 43(9 Suppl), 30S-34S.

- Obata, T., Yamanaka, Y., Kinemuchi, H., & Orelund, L. (2001). Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Research*, 906(1–2), 170–175.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, 30(1), 11–26.
- Podolak, I., Elas, M., Cieszka, K. (1998). In vitro antifungal and cytotoxic activity of Triterpene saponosides and quinoid pigments from *Lysimachia vulgaris* L. *Phytotherapy Research*, Vol 12, S70–S73.
- Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7293–7302.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-302.
- Ramadan, M.F. (2007). Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa*): an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1208-1218.
- Rice-Evans, C.A., Gopinathan, V. (1995). “Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates”. *Essays Biochem.* 29: 39–63.
- Rimbach, G., Hohler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., & Packer, L. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv Fur Tierernahrung*, 52(3), 203–222.
- Risaliti, L., Kehagia, A., Daoulizi, E., Lazari, D., Bergonzi, M.C., Vergkizi-Nikolakaki, S., Hadjipavlou-Litina, D., Bilia A.R. (2019). Liposomes loaded with *Salvia triloba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils: In vitro assessment of antioxidant, antiinflammatory and antibacterial activities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 51 493–498.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287–306.
- Schepetkin, I.A., Ramstead, A.G., Kirpotina, L.N., Voyich, J., Jutila, M.A., Quinn, M.T. (2016). Therapeutic potential of polyphenols from *Epilobium angustifolium* (Fireweed). *Phytother Res.* 30(8): 1287–1297.

Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C. M. T., Nissen, P., Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural and Molecular Biology*.

Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.

Skliar, M., Curino, A., Milanesi, L., Benassati, S., Boland, R. (2000). *Nicotiana glauca*: another plant species containing vitamin D₃ metabolites. *Plant Science* 156, 193–199.

Toth, A., Riethmuller, E., Alberti, A., Vegh, K., Kery, A. (2012). Comparative phytochemical screening of phenoloids in *Lysimachia* species. *Eur. Chem. Bull.*, 1(1-2), 27-30.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*.

Webb A., McCullough M, (2005), Dietary lignans: Potential role in cancer prevention, *Nutrition and Cancer*, 51:117-131.

Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι. *Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου* 26, 151–194.

Τσομώκου, Κ. (2015). Φυτοχημική μελέτη των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Inula candida* ssp, *limonella* και *Inula candida* ssp. *candida*. Μεταπτυχιακή διατριβή.